

Deteksi dan Identifikasi *Chrysanthemum Stunt Viroid* pada Tanaman Krisan Menggunakan Teknik *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (*Detection and Identification of Chrysanthemum Stunt Viroid on Chrysanthemum Using Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*)

Diningsih, E¹⁾, Suastika, G²⁾, Sulyo, Y¹⁾, dan Winarto, B¹⁾

¹⁾Balai Penelitian Tanaman Hias, Jl. Raya Ciherang-Pacet, Cianjur 43253

²⁾Institut Pertanian Bogor, Jl. Kamper Dramaga, Bogor 16680

E-mail : erniawati.diningsih@yahoo.com

Naskah diterima tanggal 27 November 2012 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 17 Januari 2013

ABSTRAK. *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) merupakan salah satu viroid yang menginfeksi tanaman krisan di Indonesia. Tujuan penelitian ialah untuk mengembangkan metode deteksi CSVd secara molekuler dan mengkarakterisasi CSVd isolat Indonesia. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Virologi Tumbuhan, Departemen Proteksi Tanaman, Institut Pertanian Bogor, dan Rumah Kaca serta Laboratorium Virologi, Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung, Cianjur, Jawa Barat, dari Bulan Mei 2007 sampai dengan Juni 2008. RNA total diekstraksi dari daun tanaman krisan yang dihasilkan di rumah kaca menggunakan *rneasy plant mini kits*. Genom CSVd diamplifikasi dengan pasangan primer 5'-CAACTGAAGCTTCAACGCCTT-3' dan 5'-AGGATTACTCCTGTCTCGCA-3'. Suatu fragmen dengan ukuran 250 bp mengindikasikan bahwa c-DNA CSVd berhasil diamplifikasi dari tanaman krisan sakit menggunakan teknik RT-PCR. Urutan cDNA dari salah satu CSVd isolat Indonesia berhasil ditemukan dengan urutan sebagai berikut: cttaggattactcctgtctcgcaggagtggggtcctaagcctcattcga ttgcgcg aatctcgtcgtgcacttctccagggattccccggggataccctgtaag-gaacttctcgcctcattctttaaagcagcagggttcaggagtgaccacaggaaccacaagtaagtcgccagggaacaaaactaagttccacgggtactccttagcccgtag-gctaaagaagattggaa. Urutan basa-basa tersebut memiliki tingkat kesamaan yang tinggi dengan sekuen nukleotida isolat CSVd dari Jepang, Korea, India, dan Amerika.

Katakunci: *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd); *Reverse transcriptase polymerase chain reaction*; *Dendranthema grandiflora* Kitam; *DNA sequencing*

ABSTRACT. *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) is one of the important viroids infecting chrysanthemum in Indonesia. The purpose of this research was to develop a molecular-based method to detect and characterize Indonesian CSVd isolates. The experiment was conducted at Plant Virology Laboratory, Plant Protection Department, Bogor Agriculture Institute, Screenhouse and Virology Laboratory, Indonesian Ornamental Crops Research Institute, Segunung, Cianjur, West Java, from May until June 2008. Total RNA was extracted from greenhouse-derived chrysanthemum leaves using Rneasy Plant Mini Kits. The CSVd genome was amplified with a pair of primers (5'-CAACTGAAGCTTCAACGCCTT-3' and 5'-AGGATTACTCCTGTCTCGCA-3'). A 250-bp fragment indicated that CSVd c-DNA could be successfully amplified from infected chrysanthemum plants using RT-PCR. The c-DNA sequence of one Indonesian CSVd isolate was successfully found with the following acid-base sequence: cttaggattactcctgtctcgcaggagtg ggggtcctaagcctcattcgttcgcgcaggagtggaatctcgtcgtgcacttctccagggattccccggggataccctgtaaggaacttctcgcctcattctttaaagcag-cagggttcaggagtgaccacaggaaccacaagtaagtcgccagggaacaaaactaagttccacgggtactccttagcccgtaggctaaagaagattggaa. This sequence has highly homology with sequences of CSVd isolates from Japan, Korea, India, and the USA.

Keywords: *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd); *Reverse transcriptase polymerase chain reaction*; *Dendranthema grandiflora* Kitam; *DNA sequencing*

Krisan merupakan salah satu bunga potong yang mempunyai nilai ekonomi tinggi. Hal ini terlihat pada produksi bunga potong krisan pada tahun 2011 yang menempati urutan pertama sebesar 305.889.556 tangkai atau 38,23%. Peringkat tersebut berada di atas mawar, sedap malam, melati, dan anggrek. Jika dibandingkan dengan produksi pada tahun 2010 terdapat peningkatan sebesar 65,14% (Badan Pusat Statistik & Direktorat Jenderal Hortikultura 2011). Data dari Biro Pusat Statistik 2008 menyebutkan bahwa produksi krisan pot sebesar 99.158.942 tangkai jauh di atas anggrek dengan produksi 15.343.040

tangkai, mawar 39.161.603 tangkai, dan sedap malam 21.180.043 tangkai. Sementara pemasaran untuk krisan standar di Pasar Rawa Belong pada tahun 2009 mencapai 163.106 ikat, jika dalam setiap ikat terdapat 10 tangkai, maka hasil penjualan mencapai 1.631.060 tangkai (Anonim 2010). Tingginya produksi krisan dibandingkan bunga potong lain berimplikasi pada kebutuhan benih dan varietas yang cukup tinggi pula.

Kebutuhan bibit krisan yang tinggi seringkali tidak disertai jaminan terhadap kualitasnya. Bibit krisan berkualitas yang diimpor dari negara lain umumnya banyak dikembangkan dan diproduksi oleh beberapa

perusahaan besar krisan di Indonesia, sementara pada tingkat petani pemanfaatan tanaman induk berulang menjadi realitas di lapangan karena keterbatasan permodalan. Penggunaan tanaman induk secara terus-menerus sebagai sumber bibit tanaman produksi mengakibatkan terjadinya degenerasi. Pertumbuhan tanaman terhambat (*stunting*) dengan perakaran yang terbatas, daun-daun berukuran kecil dan berwarna hijau pucat, dan jika dibandingkan dengan tanaman sehat, bunga yang dihasilkan berukuran sangat kecil dengan warna yang pudar (Hill *et al.* 1996), bahkan pembungaan lebih cepat beberapa hari karena terganggunya respons fotoperiod (Hosokawa *et al.* 2004). Penyebab utama terjadinya degenerasi pada tanaman krisan ialah *chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) yang terbawa dalam bibit (Duran *et al.* 1996).

Chrysanthemum stunt viroid merupakan patogen yang terdiri atas asam nukleat (RNA) *single stranded* dengan panjang untai 354 atau 356 nukleotida dan memiliki berat molekul RNA yang rendah (Diener & Lawson 1973). CSVd ditularkan melalui perbanyakan stek yang diambil dari tanaman induk yang terinfeksi, peralatan yang terkontaminasi, adanya tanaman sakit, dan biji (Chung BN & Ha Seung Pak 2008). Besarnya peluang kondisi tersebut menyebabkan CSVd berkembang dan menyebar lebih cepat (Kryczynski *et al.* 1988, Gora-Sochacka 2004). Menurut laporan peneliti Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung (Sulyo), kejadian penyakit yang diduga disebabkan oleh CSVd pernah terjadi di salah satu perusahaan krisan di Cianjur, Jawa Barat. Seluruh tanaman krisan kerdil dengan daun menguning. Gejala yang sama juga dilaporkan pada tanaman krisan yang ditanam di DI Yogyakarta.

Untuk menghindari kerugian yang lebih besar, fenomena degradasi pada tanaman krisan perlu diatasi. Cara yang paling menjanjikan ialah menggunakan bibit krisan bebas CSVd. Perbanyakan tanaman (stek) dari tanaman induk bebas CSVd menjadi persyaratan utama untuk penyediaan bibit krisan sehat. Selanjutnya sertifikasi penangkar benih krisan menjadi hal yang krusial yang perlu dilakukan. Dalam sertifikasi, terutama terkait dengan kesehatan bibit, metode deteksi patogen dengan akurasi tinggi sangat diperlukan. Metode deteksi virus yang biasa digunakan, yaitu metode serologi, tidak dapat diterapkan untuk mendeteksi viroid karena tidak ada mantel protein (Bos 1990). Pendekatan molekuler berbasis asam nukleat merupakan salah satu cara yang paling sesuai untuk mendeteksinya (Duran *et al.* 1996, Gora-Sochacka 2004).

Hingga saat ini terdapat tiga metode utama deteksi CSVd, yaitu *return electrophoresis* (Mosch *et al.* 1978,

OEPP/EPPO 2002), *dot-blot hybridization assay* (Candrese *et al.* 1988), dan *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR) (Hosokawa *et al.* 2006, Mehle *et al.* 2010). Namun demikian, penelitian dan pendeteksian terhadap CSVd belum pernah dilakukan di Indonesia.

Penelitian ini bertujuan mengembangkan metode deteksi CSVd berbasis molekuler menggunakan teknik RT-PCR dan mengungkap identitas molekuler CSVd isolat Indonesia melalui perunut nukleotida, membandingkannya dengan urutan nukleotida CSVd isolat lainnya yang berada di bank gen.

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini ialah CSVd dapat dideteksi dengan metode RT-PCR dan CSVd isolat Indonesia memiliki homologi yang tinggi dengan beberapa isolat CSVd dari negara lain.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Virologi Tumbuhan, Departemen Proteksi Tanaman, Institut Pertanian Bogor (IPB), Bogor, dan Rumah Kaca serta Laboratorium Virologi, Balai Penelitian Tanaman Hias (Balithi), Segunung, Cianjur, Jawa Barat, dari Bulan Mei 2007 sampai dengan Juni 2008.

Bahan Tanaman

Bagian tanaman yang digunakan dalam penelitian ini ialah daun tanaman krisan yang terinfeksi CSVd yang menunjukkan gejala kerdil yang diperoleh dari Bali, Medan, dan Cianjur. Tanaman contoh disimpan dan dipelihara di Rumah Kaca Balithi, Segunung atau daunnya disimpan dalam ruang penyimpanan -80°C di Laboratorium Virologi IPB, terutama untuk tanaman contoh dari Medan dan Bali.

Pengamatan Gejala di Lapangan

Pengamatan gejala dilakukan pada saat pengambilan contoh di lapangan.

Ekstraksi RNA Total

RNA total diekstraksi dari daun tanaman krisan menggunakan *rneasy plant mini kits* (Qiagen, Hilden, Jerman). Prosedur ekstraksi sesuai dengan instruksi perusahaan penyedia kit. Sebanyak 100 mg daun tanaman yang diduga terinfeksi CSVd digerus dalam nitrogen cair. Serbuk hasil gerusan tersebut kemudian ditambah 450 µl bufer lisis (bufer lisis mengandung 1% merkaptotanol (Qiagen, Hilden, Jerman), kemudian dimasukkan ke dalam tabung *ependorff* 1,5 ml (Axigen, California, USA) lalu dipanaskan dalam penangas air (Wealtec, US) 56°C selama 10 menit. Selanjutnya dimasukkan ke dalam

spin column ungu (Qiagen, Hilden, Jerman) dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit pada suhu ruang. Supernatan diambil dan ditambahkan 0,5 volume etanol 96% (Merck, Jakarta, Indonesia) selanjutnya dihomogenisasi dengan *pipeting*. Campuran dipindahkan ke *spin column* warna merah muda dan disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 1 menit. *Spin column* dipindahkan ke tabung yang baru kemudian ditambahkan 700 µl bufer RW I (Qiagen, Hilden, Germany) dan disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 1 menit. Cairan pada *spin column* dibuang, ditambahkan 500 µl bufer RPE (Qiagen, Hilden, Germany), kemudian disentrifugasi 2x 10.000 rpm masing-masing selama 1 dan 2 menit. *Spin column* dipindahkan ke *collection tube* (Axigen, California, USA) baru dan disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 1 menit (memastikan kolomnya bebas etanol). *Spin column* dipindahkan ke tabung *ependorf* baru 1,5 ml, kemudian ditambahkan 40 µl air bebas nuklease ke dalam kolom dan diinkubasikan selama 10 menit pada suhu ruang, selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. RNA total yang diperoleh dan terdapat dalam tabung disimpan di ruang penyimpanan pada suhu -80°C sampai digunakan.

Amplifikasi dan Perunutan Nukleotida CSVd

Amplifikasi seluruh genom CSVd dilakukan dengan teknik *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) menggunakan pasangan primer 5'-CAACTGAAGCTTCAACGCCTT-3' dan 5'-AGGATTACTCCTGTC TCGCA-3' yang dilaporkan dapat menghasilkan produk PCR dengan ukuran 250 bp (Hosokawa *et al.* 2004). Amplifikasi dilakukan pada sebuah *gene amp PCR system 9700 thermocycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reaksi RT sebanyak 25 µl terdiri dari 5 µl cetakan RNA; 5 µl dNTPs 10 mM; 2,5 µl bufer RT 10x (1x = 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 7,6], 0,1 mM EDTA, 1 mM *dithiothreitol*, 0,1% NP-40, dan 50% *glycerol* (Qiagen, Hilden, Germany), 1 µl enzim *reverse transcriptase moloney murine leukemia virus* (MmuLV) (BioLabs, London, New England), 1 µl *recombinant rnasin ribonuclease inhibitor* (Promega, Madison, WI, USA), 1,5 µl primer oligo d (T) 10 µM, dan 9 µl dH₂O. Reaksi RT dilakukan pada kondisi suhu 25°C selama 3 menit, 37°C selama 90 menit, diikuti dengan inaktivasi pada 70°C selama 15 menit.

Reaksi PCR sebanyak 25 µl terdiri dari 1 µl primer *Forward* 10 µM dan 1 µl primer *reverse* 10 µM; 2,5 µl bufer PCR 10x (1x = 10 mM KCl, 20 mM Tris-HCl [pH 8,8 pada 25°C], 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, dan 0,1% triton X-100), 0,5 µl dNTPs 10 mM, 0,2 µl *taq DNA polymerase* 5 unit/µl (New England BioLabs), dan 3 µl cetakan (cDNA). Amplifikasi cDNA dilakukan

sebanyak 35 siklus melalui tiga tahap yaitu pemisahan utas DNA (denaturasi) pada 96°C selama 30 detik, penempelan primer (*annealing*) pada 61°C selama 45 detik, dan sintesis DNA (*extention*) pada 72°C selama 1 menit. Khusus untuk siklus terakhir ditambah tahapan sintesis selama 5 menit, kemudian siklus diakhiri pada suhu 4°C (Hosokawa *et al.* 2006).

Produk hasil amplifikasi dengan PCR dielektroforesis dalam gel 1,5% agarose dengan *running buffer* TBE 1x (89 mM Tris-HCl, 89 mM *boric acid*, 2,5 M EDTA, pH 8,3). Elektroforesis dilakukan pada voltase 70 volt selama 60 menit, dengan pewarnaan menggunakan etidium bromida (EtBr) dengan konsentrasi 0,5 µl/10 ml gel dari stok EtBr 1%. Sebagai marker, digunakan *tridye* 100 bp DNA ladder (Bio Rad, Hercules, California, US).

Perunutan Asam Nukleat

Produk PCR yang murni (terbebas dari komponen lain) langsung dirunut menggunakan *direct DNA sequence kit* (Takahara Inc., Japan) dengan *DNA sequencer* (ABI, Sydney, Australia). Proses perunutan dilakukan oleh PT. Charoen Pokhphand, Jakarta.

Hasil runutan dianalisis menggunakan program *bio edit* (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA 92008). Data urutan nukleotida yang diperoleh digunakan untuk menganalisis tingkat kesamaan genetiknya dengan isolat CSVd yang berada di belahan dunia lain dan Clustal W. Filogenetik CSVd isolat Cipanas dianalisis menggunakan program Clustal X dan TreeView X (www.ebi.ac.uk).

Parameter yang diamati meliputi gejala penyakit di lapangan, pita DNA CSVd pada beberapa tanaman contoh, urutan nukleotida CSVd salah satu isolat (dipilih isolat Cipanas), kesamaan genetik CSVd isolat Cipanas dengan belahan dunia lainnya (Inggris, Jepang, Korea, USA, dan India), dan kedudukan CSVd isolat Cipanas (Indonesia) dalam pohon filogenetik. Isolat CSVd yang berasal dari Bali dan Medan hanya dipergunakan untuk mengetahui penyebaran CSVd melalui deteksi dengan RT-PCR.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gejala Tanaman Krisan Terinfeksi CSVd di Lapangan

Berdasarkan hasil pengamatan pada saat pengambilan tanaman contoh di lapangan, diketahui bahwa gejala kerdil pada tanaman krisan ditemui hampir di seluruh lokasi yang membudidayakan tanaman tersebut, seperti di beberapa tempat di Kebun Percobaan Balai Penelitian Tanaman Hias

dan kebun krisan milik swasta di daerah Cipanas, Cianjur, Jawa Barat, dengan tingkat serangan yang berbeda, bergantung pada jenis kultivar. Gejala kerdil pada tanaman krisan kadang disertai dengan penguningan pada daun dan daun menjadi lebih tipis (Gambar 1a). Gejala ini ditemukan pada sampel tanaman yang berasal dari salah satu penangkar bibit di daerah Puncak, Cianjur, Jawa Barat. Hasil deteksi menggunakan metode RT-PCR menunjukkan bahwa tanaman kerdil positif terinfeksi oleh CSVd. Gejala kerdil ada kalanya disertai dengan terjadinya malformasi pada daun, namun ada juga yang tidak, seperti ditunjukkan pada Gambar 1b. Tanaman tersebut terinfeksi oleh CSVd, walaupun daun tetap normal, namun dari segi pertumbuhan terlihat bahwa ruas-ruas batangnya menjadi pendek.

Amplifikasi Nukleotida CSVd Melalui RT-PCR

Hasil penelitian menunjukkan bahwa primer *forward* (F) (5'-CAACTGAAGCTTCAACGCCTT-3') dan primer *reverse* (R) (5'-AGGATTACTCCTGTCTCGCA-3') dapat mengamplifikasi cDNA CSVd. Keberhasilan mengamplifikasi dari sepasang primer CSVd ini ditunjukkan pada beberapa sampel tanaman krisan yang diambil dari Bali, Medan, dan Cipanas. Berdasarkan hasil visualisasi diperoleh pola pita DNA berukuran 250 bp pada empat sampel tanaman krisan, yaitu isolat Bali 3, Bali 6, Medan A, dan Cipanas (Gambar 2). Pada isolat Bali 3 dan

Cipanas pita DNA yang ditunjukkan cukup jelas pada posisi 250 bp, sedangkan pada isolat Bali 6, Medan A, dan Medan C, pita DNA yang ditunjukkan sangat lemah (kurang jelas).

Perunutan Nukleotida CSVd

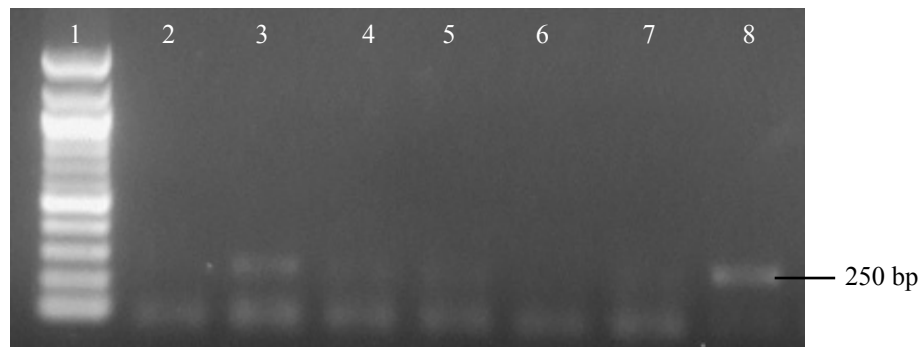
Perunutan nukleotida CSVd dilakukan menggunakan fragmen DNA produk PCR hasil amplifikasi menggunakan primer *forward* 5'-CAACTGAAGCTTCAACGCCTT-3' dan primer *reverse* 5'-AGGATTACTCCTGTCTCGCA-3'. Dalam penelitian ini hanya satu produk PCR yang digunakan untuk perunutan, yaitu produk PCR dari isolat Cipanas karena pola pita dari isolat Cipanas menunjukkan signal yang sangat jelas.

Berdasarkan hasil perunutan asam nukleat dan analisisnya diketahui bahwa CSVd isolat Cipanas memiliki urutan nukleotida sebagai berikut :

```
CTTAGGATTA CTCCTGTCTC GCAGGAGTGG
GGTCCTAAGC 1-40
CTCATTCGAT TGC GCGAATC TCGTCGTGCA
CTTCCTCCAG 41-80
GGATTTCCTT GGGGGATACC CTGTAAGGAA
CTTCTTCGCC 81-120
TCATTTCTTT TTCTTGTAAG GCAGCAGGGT
TCAGGAGTGC 121-160
ACCACAAGTAAGTCCCGAGGGAACAAAAC-
TA 161-200
```



Gambar 1. Tanaman krisan terinfeksi CSVd berdasarkan analisis dengan RT-PCR: (a) gejala kerdil pada tanaman krisan disertai dengan penguningan pada daun dan daun menjadi lebih tipis dan (b) tanaman kerdil, namun tidak menunjukkan adanya gejala pada daun, ruas-ruas batang lebih pendek (*The chrysanthemum CSVd infected plant based on RT-PCR analysis: (a) the plant was stunt, chlorosis and thinned on the leaves on CSVd infected plant and (b) the plant was stunt, but there was not the symptom on the leaf, the segment of the stem was more short*)



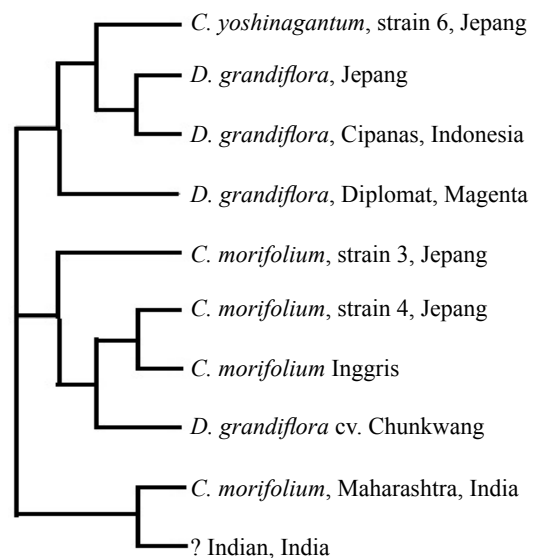
Gambar 2. Fragmen DNA beberapa isolat CSVd hasil amplifikasi (PCR) menggunakan primer F dan primer R pada gel agarose 1,5%: (1) DNA *marker* 100 bp, (2) kontrol negatif (tanaman sehat), (3) isolat Bali 3, (4) isolat Bali 6, (5) isolat Medan A, (6) isolat Medan B, (7) isolat Medan C, dan (8) isolat Cipanas. (*The DNA fragmen of CSVd isolate was resulted from PCR amplification used F and R primer on agarose gel 1.5%: (1) DNA marker 100 bp, (2) negatif control (healthy plant), (3) Bali 3 isolate, (4) Bali 6 isolate, (5) Medan A isolate (6) Medan B isolate, (7) Medan C isolate, and (8) Cipanas isolate*)

AGGTTCCACGGGCTTACTCC CTAGCCCAGG
TAGGCTAAAG 201-240
AAGATTGGAA 241-250

Urutan nukleotida tersebut merupakan panjang genom CSVd yang teramplifikasi oleh primer *forward* 5'-CAACTGAAGCTTCAACGCCTT-3' dan primer *reverse* 5'-AGGATTACTCCTGTCTCGCA-3' yang mengakit 250 bp nukleotida.

Berdasarkan hasil analisis tingkat kesamaan genetik dengan isolat CSVd yang berada di belahan dunia lain diketahui bahwa genom CSVd isolat Cipanas yang teramplifikasi oleh kedua primer di atas memiliki kesamaan genetik 99% dengan isolat K1 (*D. grandiflorum*) dari Korea, 98% dengan beberapa genom CSVd yang terdapat di *gene bank*, antara lain dengan nomor aksesori AB279770 (*Chrysanthemum yoshinaganthum*) dari Jepang, AB055974 (*D. grandiflora*) dari Jepang, AB255880 (isolat Dahlia tipe 2), DQ094298 (Vinca mayor/isolat CSVd Vm), AJ585258 (isolat India [*Chrysanthemum* sp.]), dan U82445 (isolat petunia). Dari beberapa nomor aksesori tersebut diketahui bahwa lima nomor aksesori merupakan genom CSVd isolat Jepang, dan yang lainnya berasal dari isolat Kanada, Korea, India, dan Amerika Serikat (Tabel 1).

Melalui program clustal X dan treeview X diperoleh data mengenai pengelompokan beberapa isolat CSVd yang berada di *gene bank*, termasuk CSVd isolat Cipanas (Indonesia) (Gambar 3). Dari pohon filogenetik dapat diketahui bahwa terdapat tiga kelompok besar CSVd, dan CSVd isolat Cipanas memiliki kekerabatan yang paling dekat dengan CSVd dengan nomor aksesori AB055974 (*C. yoshinaganthum*, Jepang), AB279770 (*D. grandiflora*, Jepang), dan AJ001853 (*D. grandiflora* cv. Diplomat, Magenta, USA).



Gambar 3. Pohon filogenetik *Chrysanthemum stunt viroid* (*The filogenetic tree of Chrysanthemum stunt viroid*)

Insiden penyakit yang diduga disebabkan oleh CSVd pernah terjadi pada tanaman *D. grandiflora* cv. Puspita Kencana yang ditanam oleh salah satu penangkar bibit di daerah Cipanas. Insiden penyakit ini menyebabkan terjadinya pertumbuhan yang sangat kerdil dan penguningan pada daun, sehingga tanaman mengalami kehancuran. Sejak saat itu, tidak dilakukan lagi perbanyakan terhadap jenis kultivar Puspita Kencana.

Gejala kuning pada daun dan kerdil pada tanaman krisan yang terinfeksi CSVd kemungkinan disebabkan terganggunya metabolisme tanaman, sehingga pembentukan klorofil terganggu. Sebagai akibatnya, perkembangan tanaman terhambat, karena hasil fotosintesis tidak optimal. Menurut Mumford (2001), terjadinya pengerutan pada daun krisan yang terinfeksi

Tabel 1. Homologi CSVd isolat Indonesia dengan beberapa isolat CSVd belahan dunia lain yang terdapat di gene bank (dalam persen)(The homology of Indonesian isolate CSVd with some CSVd isolate from other world in gene bank), %

Isolat (Isolates)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Dahlia Tipe 1 (Jepang)	-															
KI (Chunkwang, Korea)	99	-														
Dahlia Tipe 2 (Jepang)	98	98	-													
Strain 3 (<i>C. morifolium</i> , Jepang)	98	99	98	-												
Blanka	98	99	98	99	-											
Petunia (USA)	99	98	99	98	98	-										
Diplomat pink (USA)	98	99	98	98	99	98	-									
Ageratum (Jerman)	98	98	98	98	98	99	98	-								
Strain 4 (<i>C. morifolium</i> , Jepang)	98	99	98	99	99	98	99	97	-							
Chunkwang (Korea)	98	99	98	99	99	98	98	97	98	-						
Diplomat, Magenta	98	99	98	99	99	98	99	98	98	98	-					
Popular (Jepang)	98	99	97	99	98	98	98	98	99	98	98	-				
Maharashtra (India)	96	97	95	97	97	96	96	95	96	96	96	94	-			
Indian (India)	98	99	98	99	99	98	99	98	99	99	99	97	97	-		
Prelude coral (Jepang)	83	84	82	83	83	83	83	82	84	83	83	81	81	83	-	
<i>D. grandiflora</i> (Cipanas, Indonesia)	99	99	98	98	98	98	98	98	98	98	98	98	94	97	98	-

oleh CSVd disebabkan adanya kombinasi infeksi dengan *chrysanthemum virus B* (CVB).

Menurut Handley & Horst (1988), gejala penyakit yang disebabkan oleh CSVd dan jumlah RNA viroid yang dapat diekstraksi dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti suhu, intensitas cahaya, dan fotoperiod, baik secara individu maupun dalam kombinasi. Ekspresi gejala paling berat terjadi antara suhu 26 dan 29°C karena kisaran suhu tersebut merupakan saat yang paling baik untuk perkembangan gejala. Sementara, konsentrasi viroid maksimum terjadi antara suhu 22 dan 26°C pada saat intensitas cahaya dan fotoperiod tetap.

Pola pita DNA yang dihasilkan dalam penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Hosokawa *et al.* (2004), yang menunjukkan bahwa kedua primer tersebut dapat mengamplifikasi cDNA CSVd pada ukuran 250 bp. Terdeteksinya CSVd dengan metode RT-PCR mengindikasikan bahwa metode deteksi CSVd dengan teknik RT-PCR merupakan metode deteksi yang dapat diaplikasikan untuk mengetahui keberadaan CSVd pada tanaman krisan di Indonesia. Ukuran jelas tidaknya pita DNA yang muncul mengindikasikan bahwa konsentrasi viroid dalam tanaman krisan berbeda-beda. Pita DNA yang sangat terang menunjukkan tingginya konsentrasi CSVd dalam tanaman uji dan sebaliknya. Ketidakmunculan pita DNA pada posisi 250 bp menunjukkan bahwa tanaman uji tidak terinfeksi oleh CSVd, seperti yang

ditunjukkan oleh isolat Medan B dan kontrol negatif (tanaman sehat).

Teknik deteksi dengan RT-PCR memiliki beberapa keuntungan dan kelemahan. Deteksi dengan teknik PCR memiliki keuntungan utama, yaitu mampu menyeleksi tingkat kespesifikan dari prosedur amplifikasi. Deteksi viroid dengan RT-PCR hanya memerlukan contoh tanaman 1-100 pg dan pada umumnya 10-100 kali lebih sensitif daripada deteksi viroid dengan teknik hibridisasi menggunakan pelacak cRNA dan 2500 kali lebih sensitif daripada analisis dengan *return gel electrophoresis*. Tomassoli (2004), juga mengungkapkan bahwa teknik RT-PCR hanya memerlukan jumlah contoh jaringan yang sangat sedikit, prosedur ekstraksi, dan prosedur PCR mudah dilakukan, hanya memerlukan waktu 1 hari, dan merupakan metode diagnosis yang sangat sensitif serta spesifik. Namun, di samping keuntungan yang dimiliki, deteksi dengan RT-PCR ini juga memiliki kelemahan yaitu tidak sesuai digunakan untuk mendeteksi contoh dalam jumlah banyak dalam waktu yang bersamaan (massal) dan harganya cukup mahal.

Berdasarkan hasil analisis dapat diketahui bahwa CSVd isolat Indonesia (dalam hal ini isolat Cipanas) memiliki genom yang sangat mirip dengan genom CSVd yang berasal dari negara-negara yang disebutkan sebelumnya. Hal ini mengindikasikan bahwa CSVd isolat Indonesia kemungkinan merupakan kontaminan dari CSVd yang berasal dari isolat yang

berada di belahan dunia lainnya, seperti Jepang atau negara pengekspor bibit krisan lainnya, yang kemungkinan menyebar dan terbawa ke Indonesia bersamaan dengan bibit tanaman krisan impor. Menurut Li *et al.* (1997), penyakit kerdil pada tanaman krisan yang disebabkan oleh CSVd merupakan salah satu penyakit viroid paling penting di Jepang dan telah menyebar ke hampir semua lahan produksi krisan terutama melalui penyebaran stek yang terkontaminasi atau stok (tanaman induk).

Terjadinya penyebaran CSVd di sentra-sentra produksi krisan di Indonesia disebabkan belum tersedianya metode diagnosis untuk viroid. Badan Karantina Pertanian yang merupakan pintu gerbang bagi masuknya tanaman-tanaman krisan introduksi masih mengalami kesulitan untuk melakukan diagnosis terhadap viroid yang menginfeksi tanaman krisan, terutama CSVd. Oleh karena itu, dengan adanya penelitian mengenai pengembangan metode deteksi molekuler terhadap CSVd ini, diharapkan dapat membantu Badan Karantina Pertanian untuk melakukan tugas dalam melakukan diagnosis CSVd dengan metode yang akurat terhadap tanaman-tanaman krisan baik impor maupun ekspor. Dengan demikian tidak terjadi penyebaran CSVd lebih lanjut, baik antarnegara, maupun antardaerah di Indonesia.

Di samping itu, ditemukannya metode diagnosis terhadap CSVd di Indonesia, diharapkan dapat membantu para pemulia tanaman dalam menghasilkan varietas-varietas baru yang tahan CSVd. Bagi produsen benih, teknik ini diperlukan untuk menghasilkan produk yang terjamin kesehatannya, terbebas dari penyakit sistemik, terutama viroid, melalui deteksi dini terhadap CSVd pada planlet-planlet tanaman krisan yang dihasilkannya. Akhirnya, planlet-planlet sehatlah yang dapat digunakan untuk produksi bunga potong krisan.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Keberadaan RNA CSVd dalam tanaman krisan dapat dideteksi menggunakan teknik RT-PCR.
2. Urutan nukleotida CSVd isolat Indonesia (Cipanas) memiliki homologi yang tinggi dengan isolat CSVd lainnya yang terdapat di *gene bank*, terutama dengan isolat-isolat dari Jepang, Korea, India, dan Amerika Serikat, dengan kemiripan genom berkisar 94–99%.
3. Perlu kiranya dipertimbangkan oleh lembaga/instansi yang terkait untuk mengadopsi metode deteksi CSVd yang dikembangkan dalam penelitian ini guna menunjang sertifikasi bibit tanaman krisan di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Badan Litbang Pertanian, yang telah memberikan beasiswa untuk melanjutkan ke program S2, juga memberikan bantuan dana penelitian melalui program Kerja Sama Kemitraan Penelitian Pertanian dengan Perguruan Tinggi (KKP3T).

PUSTAKA

1. Bos, L 1990 *Pengantar virologi tumbuhan*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
2. Bouwen, I & van Zaayen, A 2003, *Chrysanthemum stunt viroid*, in Hadidi, A, Ricardo, F, Randles, JW & Semancik, JS (eds.), *Viroid*, CSIRO Publishing, Australia, pp. 218-23.
3. Candrese, T, Macquaire, G, Monsion, M & Dunez, J 1988, 'Detection of Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) using nick translated probes in a dot-blot hybridization assay', *J. Virol. Methods*, vol. 20, no. 3, pp 93-185.
4. Chung, BN, Gug Seoun Choi, Hyun Ran Kim & Jeong Soo Kim 2001, 'Chrysanthemum stunt viroid in *Dendranthema grandiflorum*', *J. Plant Pathol.*, vol. 17, no. 4, pp. 194-200.
5. Chung, BN & Ha Seung Pak 2008, 'Seed transmission of chrysanthemum stunt viroid in chrysanthemum', *J. Plant Pathol.*, vol. 24, no. 1, pp. 31-5.
6. Diener, TO, & Lawson, RH 1973, 'Chrysanthemum stunt: A viroid disease', *J. Virol.*, vol. 51, pp 94-101.
7. Biro Pusat Statistik & Direktorat Jendral Hortikultura 2011, *Produksi tanaman hias di Indonesia tahun 2007-2011*, diunduh 13 Januari 2013, <<http://www.deptan.go.id>>.
8. Direktorat Jenderal Hortikultura 2008, *Upaya perbaikan benih hortikultura untuk mengurangi impor benih serta pengembangan sentra produksi hortikultura*, diunduh 15 Mei 2008, <<http://www.deptan.go.id>>.
9. Duran, VN, Romero, DJ & Hernandez, M 1996, 'Detection and eradication of Chrysanthemum stunt viroid in Spai', *Bulletin OEPP*, vol. 26, pp. 399-405.
10. Gora-Sochacka, A 2004, 'Viroids: unusual small pathogenic RNAs', *Acta Biochimica Polonica.*, vol. 51, pp 587-607.
11. Handley, MK & Horst, RK 1988, *The effect of temperature and light on chrysanthemum stunt viroid infection of florists chrysanthemum*, *Acta Hort.*, viewed 23 March 2007, <<http://www.actahort.org>>.
12. Hill, MF, Giles, RJ, Moran, JR & Hepworth, G 1996, 'The incidence of chrysanthemum stunt viroid and chrysanthemum B carlavirus, tomato aspermy cucumovirus and tomato spotted wilt tospovirus in Australian chrysanthemum crops', *Aus. Plant Pathol.*, vol. 25, pp. 174-178.
13. Hosokawa, M, Ueda, E, Ohishi, K, Otake, A & Yazawa, S 2004a, 'Chrysanthemum stunt viroid disturbs photoperiodic response for flowering of chrysanthemum plant', *Planta.*, vol. 220, pp. 64-70.
14. Hosokawa, M, Matsushita, Y, Uchida, H & Yazawa, S 2006, 'Direct RT-PCR method for detecting two chrysanthemum viroids using minimal amount of plant tissue', *J. Virological Methods*, vol. 131, pp 28-33.

15. Hosokawa, M, Otake, A, Ohishi, K, Ueda, E, and Yazawa, S 2004b, 'Elimination of chrysanthemum stunt viroid from an infected chrysanthemum cultivar by shoot regeneration from a leaf primordium-free shoot apical meristem dome attached to a root tip', *Plant Cell Rev.*, vol. 22, pp. 859–63.
16. Kryczynski, S, Paduch CE and Skrzeczkowski 1988, 'Transmission of three viroids through seed and pollen of tomato plant', *J. Phytopathol.*, vol. 121, pp.51–7.
17. Li, S, Hataya, T, Furuta, K, Horita H, Sano, T & Shikata, E, 1997, 'Occurrence of chrysanthemum stunt diseases in Hokkaido and detection of chrysanthemum stunt viroid by electrophoresis and hybridization', *Ann. Rept. Plant Prot. North Japan*, vol. 48, pp. 113–17.
18. Mehle, N, Seljak, G, Verhoeven, JThJ, Jansen, CCC, Prezelj, N & Ravnikar, M 2010, 'Chrysanthemum stunt viroid newly reported in Slovenia', *New Dis. Rep.*, vol. 21, pp. 2.
19. Mosch, WHM, Hutinga, H, Hakkaart, FA & De Bokx, JA 1978, 'Detection of chrysanthemum stunt and potato spindle tuber viroids by polyacrylamide gel electrophoresis', *Neth. J. Plant Path.*, vol. 84, pp. 85-93.
20. Mumford, RA 2001, *Description of plant viruses: chrysanthemum stunt viroid*, Aab no. 380.
21. OEPP/EPPO 2002, 'Diagnostic protocols for regulated pests: protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés', *Bull. OEPP*, vol. 32, pp. 241-43.
22. Tomassoli, L *et al.* 2004, 'Molecular diagnosis of Chrysanthemum stunt viroid for routine indexing', *Phytopathol. Mediterr.*, vol. 43, pp. 285–88.